

Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Apolipoproteinen
des menschlichen Plasmas sowie von Plasmamembranproteinen
menschlicher Erythrozyten zur Prüfung der Frage
einer möglichen Identität beider Proteinfraktionen

von
Otto Kunz
aus
Nürnberg

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktoren: Prof. Dr. K. Brand Prof. Dr. W. Kersten

Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Apolipoproteinen
des menschlichen Plasmas sowie von Plasmamembranproteinen
menschlicher Erythrozyten zur Prüfung der Frage
einer möglichen Identität beider Proteinfractionen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Otto Kunz

aus

Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. H.-J. Horstmann
Korreferent: Prof. Dr. W. Kersten
Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.1980

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I Einleitung	1
II Material und Methoden	6
III Ergebnisse	19
1. Gelfiltration	19
2. Quantitative Proteinbestimmung	20
3. Immunelektrophorese	22
4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
IV Diskussion	38
V Zusammenfassung	45
VI Literaturverzeichnis	46

In der Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet

VLDL	Very low density lipoproteins
LDL	Low density lipoproteins
HDL	High density lipoproteins
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
SDS	Natriumdodecylsulfat
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I EINLEITUNG

Damit die zum größten Teil hydrophoben Lipide im hydrophilen Milieu des Plasmas transportiert werden können, bilden sie mit Proteinen, welche als Lösungsvermittler fungieren, Molekülkomplexe, die Lipoproteine. Diese Proteine werden als Apolipoproteine bezeichnet.

Da die Lipoproteine je nach Lipidgehalt unterschiedliche spezifische Gewichte aufweisen, lassen sie sich mit Hilfe der Ultrazentrifuge in Dichteklassen trennen. Diese Auftrennung bildet die Grundlage der Klassifikation.

Chylomikronen besitzen eine Dichte kleiner als 0,94 g/ml. Sie bleiben in der Elektrophorese am Start liegen.

Die Lipoproteine sehr geringer Dichte, VLDL, umfassen den Dichtebereich von 0,94 g/ml bis 1,006 g/ml. Sie wandern elektrophoretisch mit den Alfa-2-Globulinen und werden daher auch als Prä-Beta-Lipoproteine bezeichnet.

Die Lipoproteine geringer Dichte, LDL, besitzen spezifische Gewichte zwischen 1,006 g/ml und 1,063 g/ml. Sie wandern in der Elektrophorese mit den Beta-Globulinen.

Die Lipoproteine hoher Dichte, HDL, haben Dichtewerte zwischen 1,063 g/ml und 1,21 g/ml. Sie wandern in der

Elektrophorese mit den Alfa-1-Globulinen.

Diese Lipoproteinklasse wird unterteilt in:

HDL₂ (Dichte zwischen 1,063 g/ml und 1,125 g/ml)

HDL₃ (Dichte zwischen 1,125 g/ml und 1,210 g/ml)

Bis vor kurzem konzentrierte man sich vor allem auf die Lipide und hier vorwiegend auf Triglyceride und Cholesterin, vor allem auch im Hinblick auf deren kausalpathogenetische Bedeutung für die Arteriosklerose. So glaubte man, allein auf Grund erhöhter Plasmakonzentrationen der Triglyceride und/oder des Cholesterins, ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen ableiten zu können.

Inzwischen wird dieses Problem differenzierter betrachtet. So gewinnen z.B. die Apolipoproteine zunehmende Bedeutung. Gegenwärtig sind 8 Apolipoproteine bekannt, welche im allgemeinen nach der Nomenklatur von Alaupovic (1) benannt werden. Demzufolge unterscheidet man die Apolipoproteine A-I, A-II, B, C-I, C-II, C-III, D, E, wobei über das Apo-D noch sehr wenig bekannt ist. Neuerdings wurden die Apolipoproteine A-III (2) und F(3) beschrieben.

Bei der starren Unterteilung der Lipoproteine in Dichteklassen darf man nicht übersehen, daß die Lipoproteine in dynamischer Wechselwirkung miteinander stehen und daß es keine exakten Grenzen zwischen den einzelnen Klassen gibt. So erfaßt man mit jeder Analyse

nur einen Momentanzustand, welcher sich in kurzer Zeit möglicherweise wesentlich ändern kann. Es konnte z.B. nachgewiesen werden, daß Glycero-phospholipide zwischen den einzelnen Lipoprotein-
klassen ausgetauscht werden (4,5). Ferner konnte gezeigt werden, daß auch Apolipoproteine ausgetauscht werden. Dies wurde für die Apo-C-Proteine nachgewiesen. So wechseln Apo-C-Proteine sowohl zwischen HDL und VLDL (6), als auch zwischen HDL und Chylomikronen (7).

Man stellt sich die Lipoproteine vor als Partikel mit einem Kern aus apolaren Lipiden (Triacylglycerine und Cholesterinfettsäureester), sowie einer Hülle aus amphipathen Lipiden (Glycerophospholipide) und Apolipoproteinen (8). Die amphipathen Lipide der Hülle, die Kontakt sowohl mit dem apolaren Kern als auch mit dem umgebenden hydrophilen Milieu besitzen, können mit Lipoproteinen und anderen Strukturen ausgetauscht werden. Bei den apolaren Lipiden des Kerns ist ein derartiger Austausch vermutlich nicht möglich (9).

Eine fundamentale Eigenschaft der Apolipoproteine ist ihre Lipid-Protein-Wechselwirkung, d.h. sie sind eingeschaltet zwischen einer, zumindest teilweise, apolaren Lipidschicht und einem wäßrigen, somit also polaren Milieu. In dieser Hinsicht sind sie vergleichbar mit den integrierten Proteinen der Plasmamembran der Zellen und

gewisse Ähnlichkeiten sind durchaus denkbar.

Langdon (10) fand nun in seinen Versuchen, daß etwa die Hälfte der Proteine menschlicher Erythrozytenplasmamembranen mit Antiseren gegen menschliche Alfa-oder Beta-Lipoproteine reagiert. Er fand ferner, daß die NH_2 -terminalen und COOH -terminalen Aminosäuren der erythrozytären Plasmamembranproteine mit denen der Apolipoproteine zum Großteil identisch sind. Als Lösungsmittel für die Proteine benutzte Langdon Natriumdodecylsulfat (SDS). Er zog aus seinen Ergebnissen den Schluß, daß die Apolipoproteine des Menschen den Hauptbestandteil der integrierten Plasmamembranproteine menschlicher Erythrozyten darstellen. Die Apolipoproteine sollen dabei in der Erythrozytenmembran untereinander und mit anderen Proteinen kovalent verbunden sein. Langdon konnte damit auch ein Symptom erklären, welches bei der hereditären Erkrankung A-Betalipoproteinämie vorkommt, nämlich die Akanthozytose. Bei dieser Erkrankung kann das Apolipoprotein B auf Grund eines genetischen Defekts nicht synthetisiert werden.

Green (11) fand jedoch, daß SDS zu Präzipitationen führt und es sich dabei nicht um Antigen-Antikörper-Präzipitate handelt. In seinen Versuchen fand er z.B. Präzipitationslinien zwischen Kaninchenserum und einer 0,1 % SDS-Lösung.

Carey (12) testete Plasmamembranproteine von Erythrozyten, auch ghosts genannt, mit Lipoproteinantikörpern und Apolipoproteinantikörpern.

Außerdem Lipoproteine und Apolipoproteine mit Antikörpern gegen Erythrozytenmembranproteine. Sofern er EDTA oder das Detergens Triton X-100 zur Lösung der Proteine benutzte, erhielt er keine Präzipitationslinien mit Lipoproteinantisera. Wenn er jedoch die Membranen der Erythrozyten in 2 % SDS-Lösung löste, ergaben sich Präzipitate mit Lipoproteinantisera.

Es ist naheliegend, daß es sich bei Langdon's Resultaten um unspezifische Präzipitationen zwischen Proteinen und SDS handelte und man kann annehmen, daß die Apolipoproteine des Menschen keine integrierten Plasmamembranproteine menschlicher Erythrozyten darstellen. Auszuschließen ist jedoch nicht, daß Apolipoproteine, zumindest temporär, an die Plasmamembran der Zellen, unter anderem der Erythrozyten, adsorbiert sind. Sollte dies der Fall sein, so muß ein Teil der Membranproteine eine Identität mit Apolipoproteinen besitzen.

Wir gingen in der vorliegenden Arbeit dieser Frage nach, d.h. wir wollten prüfen, ob Plasmamembranproteine menschlicher Erythrozyten identisch sind mit Apolipoproteinen des Menschen. Wir verglichen zu diesem Zweck die elektrophoretische Mobilität dieser beiden Proteinfraktionen im Polyacrylamidgel. Grundgedanke war dabei, daß bei gleicher elektrophoretischer Mobilität von Apolipoproteinen und Plasmamembranproteinen der Erythrozyten eine Identität dieser beiden Proteinfraktionen möglich ist und weiterer Nachprüfung bedarf.

II MATERIAL UND METHODEN

1. Präparation des Plasmas

Durch Zugabe von EDTA ungerinnbares Venenblut wurde zentrifugiert (5 min bei 3000 Upm) und anschließend das Plasma vom Erythrozytensediment abgesaugt.

Wir führten insgesamt drei Versuchsreihen durch, welche in folgenden mit A,B und C benannt werden sollen.

Für Versuchsreihe A benutzten wir Blut von Spender I, für Versuchsreihe B und C untersuchten wir Blut von Spender II.

2. Ultrazentrifugation des Plasmas

Die Lipoproteine wurden aus dem Plasma durch präparative Ultrazentrifugation isoliert.

In den Versuchsreihen A und B führten wir die Präparation in Anlehnung an Redgrave (13) durch. Dazu brachten wir das Plasma durch Zugabe von 325 mg KBr pro ml auf die Dichte 1,21 g/ml, füllten 1,2 ml in jedes der 6 Zentrifugenröhrchen (Polyallomerröhrchen mit Volumen 5 ml, Höhe 5 cm, Durchmesser 1,3 cm) und überschichteten jeweils mit drei Lösungen abnehmender Dichte, sodaß ein diskontinuierlicher Dichtegradient entstand. (Siehe Abbildung 1).

Die Überschichtungslösungen bestanden aus 0,9 % NaCl, 0,01 % EDTA sowie 0,02 % NaN_3 zur Verhinderung mikrobiellen Wachstums. Die gewünschten Dichtewerte wurden durch Zugabe von KBr mit Hilfe von Dichtespindeln eingestellt.

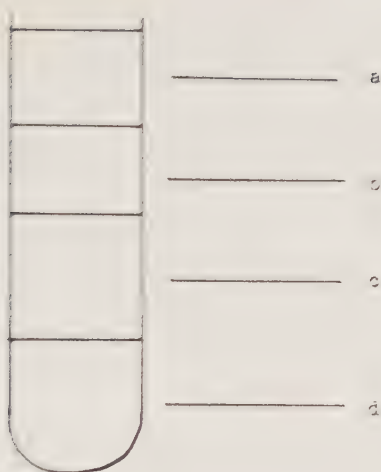


Abb. 1

Schematische Darstellung des diskontinuierlichen Dichtegradienten zur Präparation der Lipoproteine des menschlichen Plasmas durch präparative Ultrazentrifugation.

- a) 1 ml mit Dichte $d = 1,006 \text{ g/ml}$
- b) 1,3 ml mit Dichte $d = 1,019 \text{ g/ml}$
- c) 1,5 ml mit Dichte $d = 1,063 \text{ g/ml}$
- d) 1,2 ml Plasma mit Dichte $d = 1,21 \text{ g/ml}$

Die Ultrazentrifugation erfolgte mit einer Beckman Ultrazentrifuge L 50 im Schwingbecherrotor SW 50,1. Der Rotor faßte maximal 6 Röhrchen, so daß pro Lauf 7,2 ml Plasma eingesetzt werden konnten. Zentrifugiert wurde 24 Std. mit 48000 Upm bei einer Temperatur von 4°C .

Nach der Zentrifugation saugten wir den Konzentrat mit Hilfe einer Pentechinette mit U-förmig gebogener Spitze, welche an eine Pumpe angeschlossen war, frakt. collect ab.

In Versuchsreihe A saugten wir 5 Fraktionen ab und numerierten sie vom Röhrchenoberrand zum Boden hin mit Fraktion 1 bis 5.

Fraktion 1 stellte einen dünnen weißen Saum an der Oberfläche dar (Chylomikronen).

Die 4 anderen Fraktionen wurden zu etwa gleichen Volumina abgesaugt. Dabei imponierte Fraktion 3 durch eine schwache Gelbfärbung, die von den LDL herrührte.

Belassen wurde eine Schicht am Boden des Röhrchens von ca. 1 cm Höhe.

In Versuchsreihe B saugten wir drei Fraktionen mit etwa gleichen Volumina ab. Wir fanden hierbei keinen Chylomikronensaum an der Oberfläche. Die Fraktionen wurden mit Fraktion 1 bis 3 benannt, wobei hier die Fraktion 2 eine schwache Gelbfärbung aufwies (LDL).

Belassen wurde wiederum eine Bodenschicht von etwa 1 cm.

In Versuchsreihe C präparierten wir die Lipoproteine nach einem anderen Verfahren und zwar in Anlehnung an Rudel (14) und Shepherd (15). Das Plasma wurde durch Zugabe von 351,6 mg KBr pro ml auf die Dichte $d = 1,225 \text{ g/ml}$ gebracht. Je 3,5 ml wurden in Polyallomerröhrchen gefüllt. (Volumen 5 ml, Höhe 5 cm, Durchmesser 1,3 cm). Über das Plasma wurden 1,5 ml einer Lösung mit Dichte $d = 1,225 \text{ g/ml}$ geschichtet. Diese Lösung bestand aus: 0,1 M Tris, pH 7,0; 0,01 % $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und 0,9 % NaCl. Die gewünschte Dichte wurde durch Zugabe von KBr mit Dichtespindeln eingestellt.

Die Zentrifugation erfolgte über 24 Std mit 48000 Upm bei einer Temperatur von 4°C . Wir hatten für diese Methode drei Portionen Plasma mit je 21,5 ml zur Verfügung und konnten dementsprechend drei Zentrifugationen durchführen. Insgesamt konnten wir 63 ml Plasma einsetzen, pro Lauf 21 ml.

Die Lipoproteine wurden mit dieser Methode nicht in die einzelnen Dichteklassen aufgetrennt, sondern flottierten insgesamt an die Oberfläche des Röhrcheninhalts, wo sie nach der Zentrifugation mit einer Pasteurpipette abgesaugt wurden.

Der diskontinuierliche Dichtegradient für die hier beschriebene Ultrazentrifugation ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

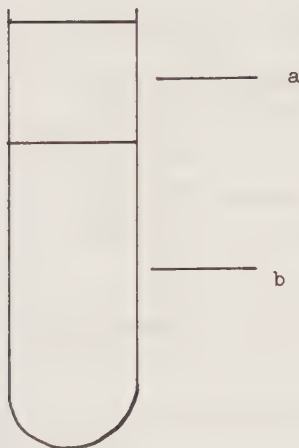


Abb. 2

Schematische Darstellung des diskontinuierlichen Dichtegradienten zur Präparation der Lipoproteine des menschlichen Plasmas durch präparative Ultrazentrifugation. Methode nach Rudel (14) und Shepherd (15).

- a) 1,5 ml Überschichtungs-
lösung mit Dichte $d = 1,225 \text{ g/ml}$
- b) 3,5 ml Plasma mit Dichte
 $d = 1,225 \text{ g/ml}$

3. Konzentrieren der Lipoproteine

Die Lipoproteinlösungen wurden in Mikrokonzentratoren der Firma Amicon GmbH (Typ 15-B) eingefüllt. Die Membranen dieser Kammern weisen eine Abtrenngrenze von Molekulargewicht 15000 auf, so daß die Lipoproteine nicht permeieren konnten. Zugleich konnte durch mehrmaliges Wiederauffüllen der Kammern mit einer KBr-freien Lösung das KBr weitgehend aus der Lipoproteinlösung entfernt werden. Diese Spüllösung hatte folgende Zusammensetzung:

Für Versuchsreihe A und B

0,9 % NaCl; 0,01 % EDTA; 0,02 % NaN_3

Für Versuchsreihe C

0,02 % NaN_3 ; 10 mM Tris, pH 7,0; 0,01 % Na_2 -EDTA;

0,9 % NaCl.

4. Gelfiltration der Lipoproteine

In Versuchsreihe C erhielten wir durch die Ultrazentrifugation ein Gemisch aller Lipoproteinklassen. Dieses Gemisch mußte zur Auftrennung in die verschiedenen Dichteklassen einer Gelfiltration unterzogen werden. Diese erfolgte in Anlehnung an Rudel (14) und Shepherd (15). Die Lipoproteine der drei Zentrifugationen wurden dabei getrennt fraktioniert.

Als Gel benutzten wir Sepharose 4 b der Firma Pharmacia, als Fraktionssammler den Typ Ultrorac der Firma LKB.

Der Elutionspuffer enthielt: 10 mM Tris, pH 7,0;

0,01 % Na_2 -EDTA; 0,9 % NaCl; 0,02 % NaN_3 .

Die konzentrierte Lipoproteinlösung wurde durch Zugabe dieses Elutionspuffers auf ein Volumen von ca. 1 ml gebracht und anschließend auf die Geloberfläche aufgetragen. Die Gelsäule hatte einen Durchmesser von 2,5 cm und eine Länge von 85 cm. Als Pumpe benutzten wir eine Perplex-Pumpe der Firma LKB mit einer Durchflußrate von 15 ml/h. Der Fraktionssammler wurde so eingestellt, daß er pro Reagenzglas 3 ml, entsprechend 50 Tropfen, sammelte. Die Lipoproteinkonzentration im Eluat wurde mit einem Durchflußphotometer der Firma LKB fortlaufend durch Messung der Extinktion bei 254 nm registriert. Im Anschluß an die Gelfiltration wurde das Eluat mit Mikrokonzentratoren vom Typ B 15 (Amicon) konzentriert. Die hierfür verwendete Spülösung und der Elutionspuffer der Gelfiltration hatten die folgende Zusammensetzung: 10 mM Tris, pH 7,0; 0,01 % Na₂-EDTA; 0,9 % NaCl; 0,02 % NaN₃. Die Versuchsanordnung der Gelfiltration ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

5. Präparation der Erythrozytenmembranen (ghosts)

Die Präparation der ghosts erfolgte nach der Methode von Dodge, Mitchell und Hanahan (16), in der Modifikation von Steck et al. (17) und Anselstetter (18). Bei Anselstetter (18) findet sich die genaue Vorschrift, nach der die in dieser Untersuchung verwendeten Erythrozytenmembranen präpariert wurden. Die Präparation erfolgte nach dem Prinzip der hypotonen Hämolyse (16). Ghosts sind demnach als die posthämolytischen Rückstände von Erythrozyten zu verstehen (19).

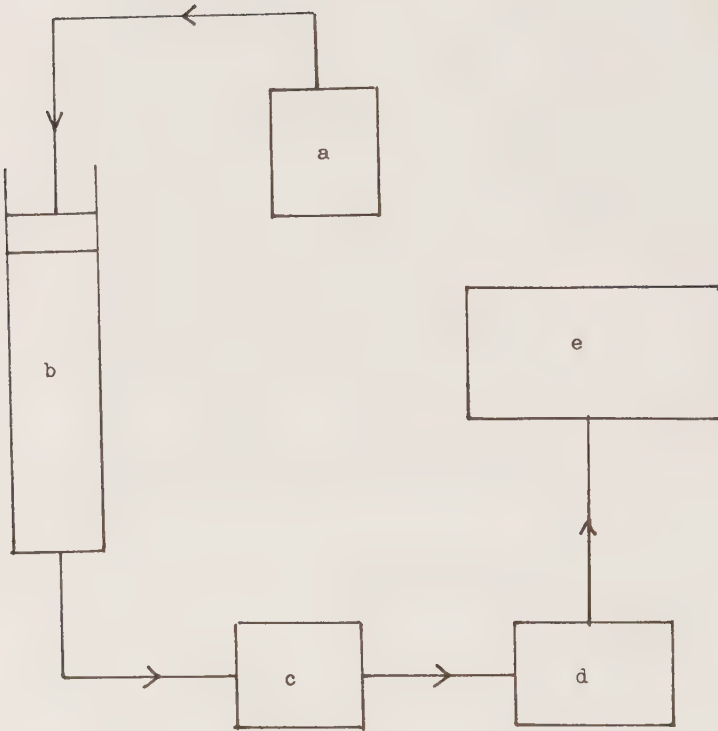


Abb. 3

Schema der Versuchsanordnung zur Auftrennung der Lipoproteine in die einzelnen Dichteklassen mittels Gelfiltration. Die Pfeile geben die Flußrichtung an.

- a) Behälter mit Elutionspuffer
- b) Gelsäule
- c) Durchflußphotometer
- d) Perperxpumpe
- e) Fraktionssammler

6. Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (20), in der Modifikation von Wang (21). Als Standard wurde eine Albuminlösung bekannter Konzentration benutzt. Die Erythrozytenmembranproteine und die Apolipoproteine wurden in gleicher Weise quantitativ bestimmt.

Zu 100 μ l der zu untersuchenden Lösung wurden 500 μ l 0,12 % Triton X-100 gegeben. Von der hiermit entstandenen Ansatzlösung wurden zu je 100 μ l ebenfalls 100 μ l Triton X-100 (0,1 %) sowie 1 ml alkalisches Cu-Reagens gegeben. Nach 15 min bei Zimmertemperatur wurden 1 ml 10 % SDS sowie 0,1 ml Phenolreagens hinzugefügt. Nach weiteren 30 min bei Zimmertemperatur erfolgte die Photometrie bei 500 nm. Der Leerwert enthielt außer der zu untersuchenden Lösung alle Reagentien in analoger Konzentration.

Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe einer Standardgeraden. Genaue Werte konnten nur innerhalb eines Proportionalitätsbereiches erhalten werden (22). Wurde dieser Bereich über- bzw. unterschritten, so konnten die Proteinkonzentrationen nur ungefähr angegeben werden.

7. Immunelektrophorese der Lipoproteine

Die Immunelektrophorese der Lipoproteine wurde mit der Apparatur LKB 2117 Multiphor durchgeführt. Die genaue Versuchsvorschrift wurde von der Firma LKB mitgeliefert, (23,24).

Die Elektrophorese wurde in 1 % Agarose durchgeführt. Die Agarose stammte von den Firmen Behring bzw. Serva. Auf die Glasplatten, die eine Fläche von 9,4 x 8,4 cm hatten, wurden je 12,5 ml des heißen, flüssigen Gels aufgetragen, welches sich gleichmäßig verteilte und nach wenigen Minuten fest war. Anschließend wurden die Löcher für die zu untersuchenden Lösungen, in diesem Fall also die Antigene, mittels einer Schablone ausgestanzt. In gleicher Weise schnitten wir die Rinnen für die Antikörper aus. Diese Gelscheiben wurden erst nach der Elektrophorese herausgenommen.

Unmittelbar vor der Elektrophorese pipettierten wir in die ausgestanzten Löcher jeweils etwa 10 µl der aufzutrennenden Proteinlösungen. Die Elektrophorese wurde mit der konstanten Spannung von 150 V für die Dauer von etwa 90 min durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die bereits ausgeschnittenen Gelstreifen für die Antikörperinnen herausgenommen und pro Rinne ca. 150 µl der unverdünnten Antikörperlösung eingefüllt.

Daran schlossen sich an: Immundiffusion 24 Std

Trocknen 24 Std

Waschen in 0,9 % NaCl Lsg. 5 Std.

Färben und Entfärben je 30 min

Die für diese Untersuchungen verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Färbelösung: 5 g Coomassie Brilliant Blau

450 ml Äthanol

100 ml Eisessig

450 ml H₂O

Entfärbelösung: 450 ml Äthanol
100 ml Eisessig
450 ml H₂O

Puffer für die Elektrophorese:

Stammlösung 1	Stammlösung 2
1,035 g Barbitol	28,1 g Glycin
6,5 g Barbitol-Na	22,6 g Tris
0,25 g NaN ₃	0,25 g NaN ₃
H ₂ O ad 1l	H ₂ O ad 1l

Durch Mischen von 1 Volumeneinheit Stammlösung 1
1 Volumeneinheit Stammlösung 2
3 Volumeneinheiten H₂O

entstand der Puffer für die Elektrophorese, der eine
Jonenstärke von 0,02 hatte.

Mit diesem Puffer wurden auch die Agarosegele hergestellt,
sowie die zu untersuchenden Substanzen verdünnt, falls dies
erforderlich war.

8. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Herstellen der Gele und die Elektrophorese erfolgten
nach der Versuchsvorschrift von Anselstetter (18).

Die Gele wurden wie folgt hergestellt:

4,8 ml 40 % Acrylamid
2,0 ml 2,5 % BIS
10 ml 0,25 M Phosphatpuffer pH 7,1
0,3 ml 20 % SDS
1,2 ml 1,5 % Ammoniumpersulfat
H₂O ad 39,2 ml

Die so entstandene Lösung wurde evakuiert und nach Zugabe
von 0,8 ml 1 % TEMED in die Gelröhrchen eingefüllt.

Diese hatten eine Höhe von 13 cm und einen Innendurchmesser von 0,5 cm. Die Gellösung wurde bis zu einer Höhe von 11 cm eingefüllt und anschließend mit H_2O überschichtet. Am nächsten Tag konnten die Gele benutzt werden. Sollten die Gele länger aufbewahrt werden, so mußten sie mit Gelpuffer überschichtet werden. Dieser setzte sich wie folgt zusammen: 5,0 ml 0,25 M Phosphatpuffer pH 7,1
0,15 ml 20 % SDS
 H_2O ad 20,0 ml

Elektrophorese

Zur Lösung der Erythrozytenmembranen bzw. der Lipoproteine wurde die folgende Lösung benutzt:

25 μ l 0,25 M Phosphatpuffer pH 7,1
40 μ l 20 % SDS
10 μ l 0,1 M EDTA
5 μ l β -Mercaptoäthanol

Zu 20 μ l der zu untersuchenden Lösung wurden 8 μ l dieser Lösung gegeben. Dieses Gemisch wurde 5 min im siedenden Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 22 μ l 40 % Glycerin sowie 0,5 μ l β -Mercaptoäthanol zugegeben. Dem Glycerin war eine Spur des roten Farbstoffs Pyronin G beigemischt worden. Dieser Farbstoff wanderte in der Elektrophorese vor den Proteinbanden und stellte somit eine Art Markierung dar.

Das so entstandene Gemisch wurde 10 min bei 37⁰ inkubiert und anschließend auf die Geloberfläche aufgetragen.

Die Gelröhrchen wurden mit Elektrodenpuffer fast rand-

voll gefüllt, anschließend das zu untersuchende Material unterschichtet.

Der Gelpuffer bestand aus:

200 ml 0,25 M Phosphatpuffer pH 7,1

5 ml 20 % SDS

H₂O ad 1l

Die Elektrophorese wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Stromstärke betrug pro Gel:

10 min 2,5 mA

20 min 5 mA

3 Std. 7,5 mA

Gesamtdauer der Elektrophorese somit 3,5 Std.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus den Röhrchen herausgespült, über Nacht mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt und anschließend ca. 2 Tage lang entfärbt.

Splitgeltechnik (18)

Im Hinblick auf die Themenstellung war es wichtig, Membranproteine und Apolipoproteine unter genau denselben Bedingungen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck schoben wir einen starren, mit Paraffin getränkten Papierstreifen in das Röhrchen, bis dieser ein kleines Stück im Gel steckte. Der Raum oberhalb des Gels wurde somit in zwei gleich große Kompartimente geteilt, zwischen denen kein Flüssigkeitsaustausch stattfinden konnte. Es war somit möglich, zu prüfen, inwieweit Membranproteine und Apolipoproteine unter gleichen Bedingungen identische elektrophoretische Mobilität aufweisen.

Schließlich wurden die Molekulargewichte der Apolipoproteine anhand ihrer Relation zu den Membranproteinen

geschätzt. Anselstetter (18) hat die Molekulargewichte der Membranproteine nach der Methode von Weber und Osborne (25) sowie Dunker und Rückert (26) unter den gleichen, hier verwendeten Bedingungen bestimmt.

9. Dokumentation

Die gefärbten Gele der Immunelektrophorese und der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden im durchscheinenden Licht fotografiert (18).

(Leitz:Leica,Reprovit II a,Leuchtkasten,Typ 42-677.103)

III ERGEBNISSE

1. Gelfiltration

In Versuchsreihe C erhielten wir durch die Ultrazentrifugation zur Präparation der Lipoproteine ein Gemisch aller Lipoproteinklassen, welche durch Gelfiltration aufgetrennt wurden.

Wir erhielten zwei Fraktionen, wobei die erste aus Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL) und Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) bestand, die zweite Fraktion aus Lipoproteinen hoher Dichte (HDL). Der Bereich dazwischen stellte ein Gemisch aller drei Dichteklassen dar. Chylomikronen fehlten, da es sich um Nüchternblut handelte.

Die Ergebnisse der Gelfiltration sind in Abb. 4 schematisch dargestellt.

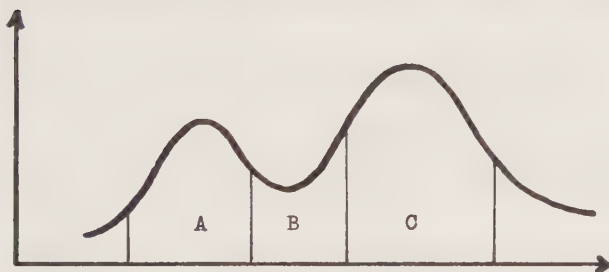


Abb. 4

Schematische Darstellung des Ergebnisses der Auftrennung der Lipoproteine in die einzelnen Dichteklassen mittels Gelfiltration und Extinktionsmessung bei 254 nm.

A = VLDL + LDL

B = Zwischenfraktion (VLDL + LDL + HDL)

C = HDL

2. Quantitative Proteinbestimmung

Um zu wissen, welche Mengen wir bei der elektrophoretischen Auftrennung der Membranproteine der Erythrozyten und der Apolipoproteine auftragen mußten, führten wir eine quantitative Proteinbestimmung beider Proteinfractionen durch.

In der Versuchsreihe A erhielten wir durch die präparative Ultrazentrifugation der Lipoproteine eine Auftrennung in die einzelnen Dichteklassen, wobei wir 5 Fraktionen absaugten, welche wir in der Reihenfolge zunehmender Dichte mit den Nummern 1 bis 5 bezeichneten.

Fraktion 1, ein schmaler weißer Saum an der Oberfläche des Zentrifugenröhrchens, bestand aus Chylomikronen und besaß eine solch geringe Proteinkonzentration, daß diese für weitere Untersuchungen nicht ausreichte. Es handelte sich bei diesem Versuch also offenbar nicht um Nüchternblut.

Fraktion 2, die aus VLDL und LDL bestand, besaß eine Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml.

Fraktion 3, bestehend aus LDL, besaß eine Proteinkonzentration von 0,7 mg/ml.

Fraktion 4 hatte eine Proteinkonzentration von 18 mg/ml, Fraktion 5 eine solche von 11 mg/ml. Fraktion 4 und 5 bestanden aus LDL.

Die ghosts für diese Versuchsreihe stammten von einem anderen Spender, die Proteinkonzentration war bekannt.

In Versuchsreihe B erhielten wir durch die Ultrazentrifugation der Lipoproteine ebenfalls eine Auftrennung in die

verschiedenen Dichteklassen. Chylomikronen fanden sich in diesem Fall keine, da es sich um Nüchternblut handelte. Wir saugten 3 Fraktionen ab, die wir in der Reihenfolge zunehmender Dichte mit den Nummern 1 bis 3 bezeichneten.

Fraktion 1, bestehend aus VLDL und LDL, hatte eine Proteinkonzentration von 2,1 mg/ml.

Fraktion 2, welche aus LDL und HDL bestand, wies eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml auf.

Fraktion 3, welche nur aus HDL bestand, hatte eine Proteinkonzentration von 29,1 mg/ml.

Die Erythrozytenmembranen, die vom selben Spender stammten, hatten eine Proteinkonzentration von 6,7 mg/ml.

In der Versuchsreihe C mußten wir nach der präparativen Ultrazentrifugation der Lipoproteine diese durch Gelfiltration in die Dichteklassen auftrennen. Wir erhielten dabei 3 Fraktionen (siehe Abb. 4 S.19), welche wir in der Reihenfolge zunehmender Dichte mit A, B und C bezeichneten.

Fraktion A bestand aus VLDL und LDL und hatte eine Proteinkonzentration von 2,2 mg/ml.

Fraktion B bestand aus LDL und HDL und hatte eine Proteinkonzentration von 9,4 mg/ml.

Fraktion C, die aus HDL bestand, besaß eine Proteinkonzentration von 25,2 mg/ml.

Die ghosts, die vom selben Spender stammten, besaßen eine Proteinkonzentration von 5,4 mg/ml.

3. Immunelektrophorese

Bevor wir die elektrophoretische Mobilität der Apolipoproteine mit jener der Plasmamembranproteine der Erythrozyten verglichen, wollten wir prüfen, ob die Lipoproteine rein isoliert worden waren und keine anderen Plasmaproteine beigemischt waren. Wir benutzten dazu die sehr genaue Methode der Immunelektrophorese. Als Antikörper benutzten wir zum einen Anti-Serum, d.h. ein Gemisch von Antikörpern gegen sämtliche Plasmaproteine. Zum anderen setzten wir spezifische Antikörper gegen Lipoproteine ein.

1) Anti- Alfa_1 : Dieser Antikörper reagiert mit Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) und nicht mit den anderen Dichteklassen.

2) Anti-Beta: Dieser Antikörper reagiert nur mit Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL) und Lipoproteinen geringer Dichte (LDL).

Es war also mit Hilfe der Immunelektrophorese möglich, eventuelle Verunreinigungen mit Plasmaproteinen festzustellen. Außerdem konnten wir die Lipoproteinfraktionen, die wir unmittelbar durch die Ultrazentrifugation bzw. durch anschließende Gelfiltration gewannen, genau definieren bezüglich der Frage, welche Dichteklassen darin enthalten sind.

In Versuchsreihe A, in welcher wir nach der Ultrazentrifugation die Fraktionen 1 bis 5 absaugten, ergab sich folgendes Resultat:

Fraktion 1 (Chylomikronen) wurde auf Grund des sehr geringen Proteingehaltes nicht weiter untersucht.

Fraktion 2 zeigt eine deutliche Reaktion mit Anti-Beta, jedoch keine Reaktion mit Anti-Alfa₁. Fraktion 2 besteht also aus VLDL und LDL, enthält keine HDL.

Fraktion 3 reagiert deutlich mit Anti-Beta als auch mit Anti-Alfa₁. Diese Fraktion besteht aus LDL und HDL.

Fraktion 4 und 5 reagieren deutlich mit Anti-Alfa₁ und bestehen demnach aus HDL.

Die Resultate der Versuchsreihe A sind in Tabelle 1 sowie in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt.

Tab. 1

Immunelektrophoretische Untersuchungen der Lipoproteinfraktionen der Versuchsreihe A, welche durch präparative Ultrazentrifugation gewonnen wurden.

Fraktion	Reaktion mit	
	Anti-Alfa ₁	Anti-Beta
2	-	+
3	++	++
4	+++	-
5	+++	-

Es bedeutet: - keine Reaktion
+ schwache Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ sehr starke Reaktion

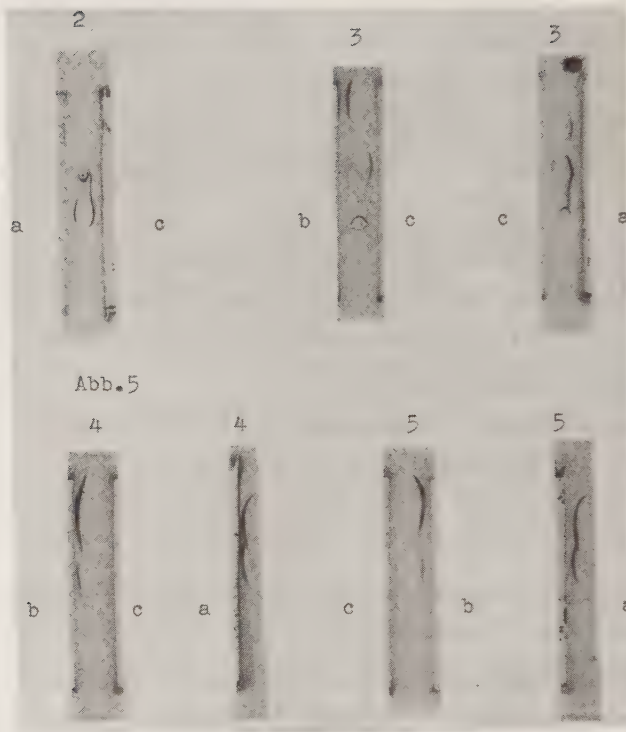


Abb. 6

Abb. 5 und 6

Immunelektrophoretische Untersuchung der Lipoproteinfraktionen der Versuchsreihe A, welche durch präparative Ultrazentrifugation gewonnen wurden.

Die Ziffern oberhalb der einzelnen Bilder entsprechen der jeweiligen Fraktionsnummer.

Die Buchstaben zwischen den Bildern bedeuten:

- aAnti-Serum
- bAnti-Alfa₁
- cAnti-Beta

In Versuchsreihe B, in welcher wir nach der präparativen Ultrazentrifugation drei Fraktionen absaugten und diese mit zunehmender Dichte mit den Nummern 1 bis 3 benannten, ergaben die immunoelektrophoretischen Untersuchungen folgende Resultate:

Fraktion 1 reagiert schwach mit Anti-Beta.

Sie besteht aus VLDL und LDL.

Fraktion 2 reagiert mit Anti-Alfa₁ und mit Anti-Beta.

Sie besteht aus LDL und HDL.

Fraktion 3 reagiert deutlich mit Anti-Alfa₁ und besteht demnach aus HDL.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe B sind in Tabelle 2 und den Abbildungen 7 und 8 zusammengefaßt.

Tab. 2

Immunelektrophoretische Untersuchungen der Lipoproteinfraktionen der Versuchsreihe B, welche durch präparative Ultrazentrifugation gewonnen wurden.

Fraktion	Reaktion mit	
	Anti-Alfa ₁	Anti-Beta
1	-	+
2	++	++
3	-	+++

Es bedeutet: - keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

Abb.7

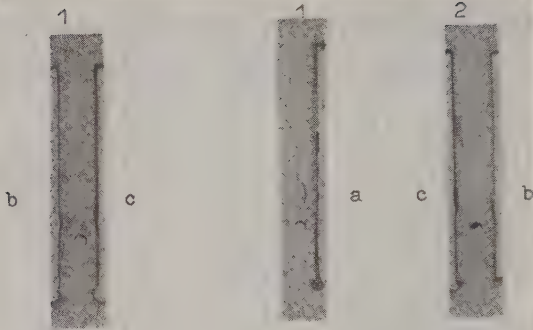


Abb.8

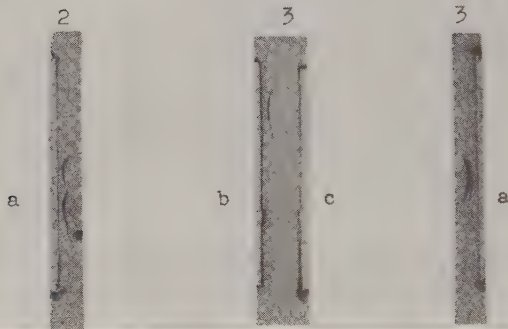


Abb. 7 und 8

Immunelektrophoretische Untersuchung der Lipoproteinfraktionen der Versuchsreihe B, welche durch präparative Ultrazentrifugation gewonnen wurden. Die Ziffern über den Bildern entsprechen der jeweiligen Fraktionsnummer.

Die Buchstaben zwischen den Bildern bedeuten:

a.....Anti-Serum

b.....Anti-Alfa₁

c.....Anti-Beta

In Versuchsreihe C ,in welcher wir die Lipoproteinfraktionen durch präparative Ultrazentrifugation und anschließende Gelfiltration gewannen,wobei wir drei Fraktionen (A,B und C) erhielten,ergab die Immunelektrophorese folgendes Resultat:

Fraktion A reagiert nur mit Anti-Beta.Sie besteht demnach aus VLDL und LDL.

Fraktion B reagiert sowohl mit Anti-Beta als auch mit Anti-Alfa₁.Diese Fraktion besteht aus LDL und HDL.

Fraktion C besteht ausschließlich aus HDL,da sie nur mit Anti-Alfa₁ reagiert.

Die Resultate sind in Tabelle 3 sowie in den Abbildungen 9 und 10 zusammengefaßt.

Tab. 3

Immunelektrophoretische Untersuchungen der Lipoproteinfraktionen der Versuchsreihe C,welche durch präparative Ultrazentrifugation und anschließende Gelfiltration gewonnen wurden.

Fraktion	Reaktion mit	
	Anti-Alfa ₁	Anti-Beta
A	-	++
B	++	++
C	+++	-

Es bedeutet: - keine Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ starke Reaktion

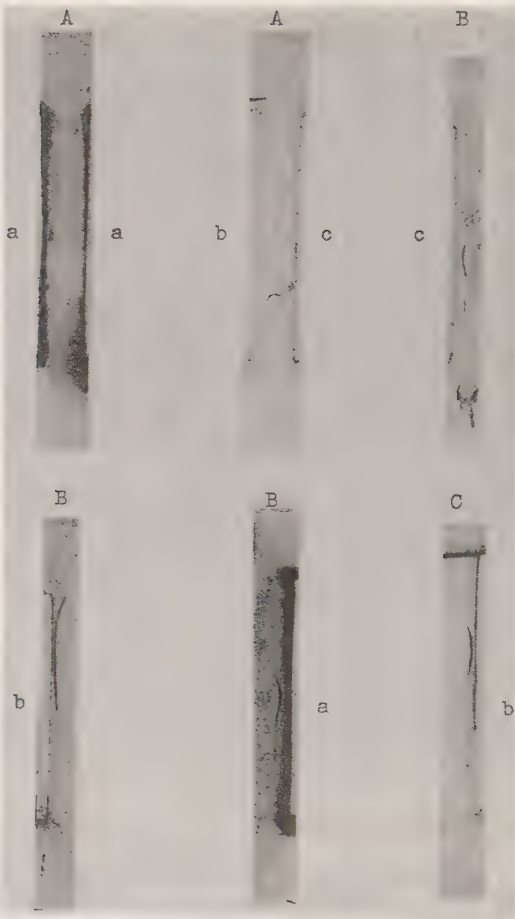


Abb 9

Abb 10

Abb.9 und 10

Immunelektrophoretische Untersuchung der Lipoproteinfraktionen der Versuchsreihe C, welche durch präparative Ultrazentrifugation und anschließende Gelfiltration gewonnen wurden. Die Fraktionen wurden benannt mit A,B,C. Die Buchstaben über den Bildern entsprechen der Fraktion. Die Buchstaben zwischen den Bildern bedeuten:

- a..... Anti-Serum
- b..... Anti-Alfa₁
- c..... Anti-Beta

Die Resultate der Immunelektrophorese erlauben uns folgende Aussagen:

Die verwendete Methodik ist geeignet, Lipoproteine rein aus dem Plasma zu isolieren. Für die von uns im Anschluß an die Immunelektrophorese durchgeführte Polyacrylamid-Gelelektrophorese war es von entscheidender Bedeutung, daß die Apolipoproteine nicht durch andere Plasmaproteine verunreinigt waren. Da nun durch die Immunelektrophorese eine derartige Verunreinigung ausgeschlossen werden konnte und dieser Ausschluß mit einer sensibleren Methode durchgeführt wurde als sie die Polyacrylamid-Gelelektrophorese darstellt, können wir sicher sein, daß es sich bei allen Banden des Lipoproteinkompartiments in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese um Apolipoproteine handelt.

Wir können weiterhin feststellen, daß die Methodik geeignet ist, die Lipoproteine in die verschiedenen Dichteklassen aufzutrennen. Da die Fraktionierung doch willkürlich war, ist es zu erwarten gewesen, daß sich die Dichteklassen (VLDL, LDL, HDL) in den einzelnen Fraktionen überlappen. Dies ist jedoch für unsere Untersuchungen ohne Bedeutung.

4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob eine Identität zwischen Apolipoproteinen und Plasmamembranproteinen der Erythrozyten besteht. Wir wollten zu diesem Zweck elektrophoretische Mobilität dieser beiden Proteinfractionen im Polyacrylamidgel unter gleichen Versuchsbedingungen vergleichen.

In Versuchsreihe A, in welcher wir nach der präparativen Ultrazentrifugation des Plasmas die Lipoproteine in 5 Fraktionen absaugten und diese in der Reihenfolge zunehmender Dichte mit den Nummern 1 bis 5 bezeichneten, ergaben die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen folgendes Resultat:

Fraktion 1 (Chylomikronen) wurde wegen des sehr geringen Proteingehalts nicht weiter untersucht.

Fraktion 2 (VLDL und LDL) weisen an Apoproteinen das Apoprotein B auf, welches sich als Doppelbande darstellt und ein Molekulargewicht von ca. 260000 besitzt.

Fraktion 3 (LDL und HDL) weist neben dem Apoprotein B das Apoprotein A-I mit einem Molekulargewicht von 28300 auf.

Fraktion 4 und Fraktion 5 (HDL) besitzen das Apoprotein B in geringer Menge, bestehen aber in erster Linie aus dem Apoprotein A-I und dem Apoprotein A-II welches sich als Doppelbande darstellt und ein Molekulargewicht von 17000 besitzt.

Außer diesen drei Apolipoproteinen (B, A-I, A-II) fanden wir im Gel eine Reihe weiterer, größtenteils sehr feiner Banden, die jeweils gekoppelt an VLDL und LDL oder aber HDL auftraten und bei welchen es sich nach den immunoelektrophoretischen Ergebnissen zu schließen, um Apolipoproteine handeln muß. Über diese Proteine können wir jedoch keine Aussage machen. Die Resultate der Versuchsreihe A sind in Abbildung 11 dargestellt (S. 31).

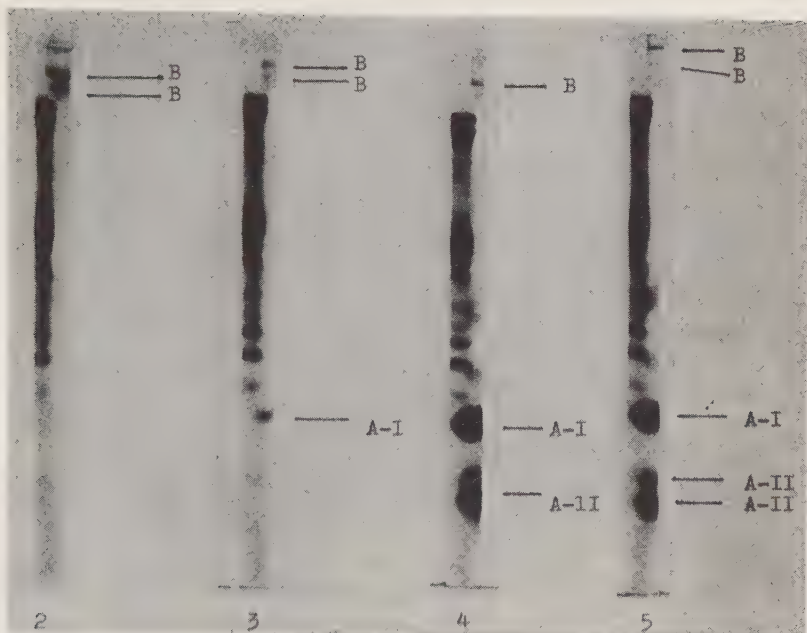


Abb. 11

Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Versuchsreihe A, in welcher wir nach der präparativen Ultrazentrifugation des Plasmas die Lipoproteine in 5 Fraktionen absaugten. Splitgeltechnik.

Am jeweils rechten Bildrand sind die Apolipoproteine benannt, die jeweils im rechten Kompartiment aufgetragen wurden. Im linken Kompartiment wurden die Erythrozytenmembranproteine aufgetragen.

Die Nummern am unteren Bildrand entsprechen der jeweiligen Fraktionsnummer. Aufgetragen wurden folgende Mengen:

Fraktion 2) 30 µg Membranproteine/15 µg Apolipoproteine

Fraktion 3) 30 µg Membranproteine/15 µg Apolipoproteine

Fraktion 4) 30 µg Membranproteine/15 µg Apolipoproteine

Fraktion 5) 30 µg Membranproteine/10 µg Apolipoproteine

In Versuchsreihe B saugten wir die Lipoproteine nach der präparativen Ultrazentrifugation in drei Fraktionen ab und benannten sie mit zunehmender Dichte mit 1 bis 3. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese dieser drei Lipoproteinfraktionen erhielten wir folgende Ergebnisse:

Fraktion 1 (VLDL und LDL) zeigt das Apoprotein B mit einem Molekulargewicht von ca. 260000.

Fraktion 2 (LDL und HDL) zeigt die Apoprotein B Bande, außerdem die Bande des Apoproteins A-I und ganz schwach die Bande des Apoproteins A-II.

Fraktion 3 zeigt noch eine ganz feine Apoprotein B Bande. Ferner erkennt man deutlich die Banden der Apolipoproteine A-I und A-II.

Analog zur Versuchsreihe A tauchen auch in dieser Versuchsreihe eine Reihe weiterer Banden auf, die nach den Immunelektrophoretischen Ergebnissen als Apolipoproteine zu identifizieren sind. Wir können diese Proteine jedoch nicht benennen, sondern sie lediglich als VLDL-LDL-bzw. HDL-Apolipoproteine bezeichnen.

Die Resultate der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aus Versuchsreihe B sind in Abbildung 12 zusammengefaßt.

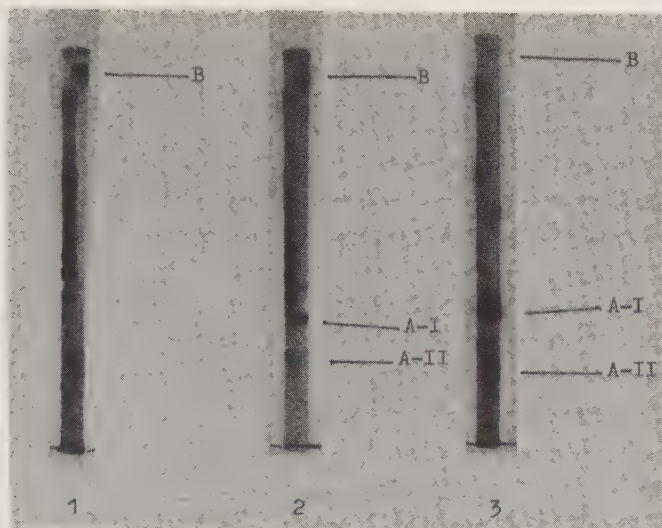


Abb. 12

Resultate der Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Versuchsreihe B, in welcher wir nach der präparativen Ultrazentrifugation des Plasmas die Lipoproteine in drei Fraktionen absaugten.

Am jeweils rechten Bildrand sind die Apolipoproteine benannt, die jeweils im rechten Kompartiment aufgetragen wurden. Im linken Kompartiment wurden die Erythrozytenmembranproteine aufgetragen.

Die Nummern am unteren Bildrand entsprechen der jeweiligen Lipoproteinfraktionsnummer.

Aufgetragen wurden folgende Mengen:

Fraktion 1) 27 μ g Membranproteine/15 μ g Apolipoproteine

Fraktion 2) 27 μ g Membranproteine/20 μ g Apolipoproteine

Fraktion 3) 27 μ g Membranproteine/12 μ g Apolipoproteine

In Versuchsreihe C erhielten wir nach der präparativen Ultrazentrifugation des Plasmas ein Lipoproteingemisch aller Dichteklassen, welches wir durch Gelfiltration in die Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL), geringer Dichte (LDL) und hoher Dichte (HDL) auftrennten.

Wir teilten das Eluat der Gelfiltration, welches die Lipoproteine in Lösung enthielt in drei Fraktionen auf, die wir in der Reihenfolge zunehmender Dichte mit den Buchstaben A, B und C bezeichneten.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dieser drei Fraktionen erbrachte folgende Resultate:

Fraktion A, die aus VLDL und LDL besteht, zeigt die Bande des Apolipoprotein B, welches ein Molekulargewicht von ca. 260000 besitzt.

Fraktion B, die LDL und HDL enthält, zeigt eine dünne Apolipoprotein B Bande, außerdem deutliche Banden der Apolipoproteine A-I und A-II.

Fraktion C, die aus HDL besteht, zeigt deutliche Banden der Apolipoproteine A-I und A-II, welche ja bekanntlich den größten Proteinanteil der HDL ausmachen.

Auch in dieser Versuchsreihe zeigen sich wieder mehrere Apolipoproteine, die jedoch nicht benannt werden können. Daß es sich um Apolipoproteine handelt, ist durch die Immunelektrophorese gesichert worden.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Versuchsreihe C bzw. deren Resultate sind in Abbildung 13 zusammengefaßt.

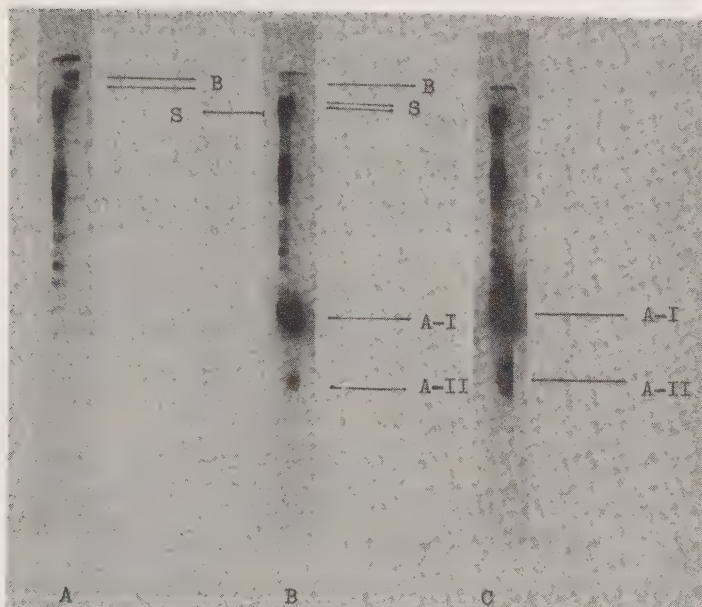


Abb. 13

Resultate der Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Versuchsreihe C, in welcher wir die Lipoproteine durch präparative Ultrazentrifugation und Gelfiltration präparierten und sie in die Fraktionen A, B und C einteilten.

Am jeweils rechten Bildrand sind die Apolipoproteine benannt, die jeweils im rechten Kompartiment aufgetragen wurden. Im linken Kompartiment wurden die Erythrozytenmembranproteine aufgetragen.

Die Buchstaben am unteren Bildrand entsprechen der jeweiligen Lipoproteinfraktion.

Aufgetragen wurden folgende Mengen:

Fraktion A) 30 µg Membranproteine/15 µg Apolipoproteine

Fraktion B) 30 µg Membranproteine/50 µg Apolipoproteine

Fraktion C) 30 µg Membranproteine/100 µg Apolipoproteine

S.... Spectrin (Erythrozytenmembranprotein), welches zum Teil in das Apolipoproteinkompartiment überlief.

Ziel unserer Untersuchungen war es, zu prüfen, ob Apolipoproteine des Menschen und Plasmamembranproteine der menschlichen Erythrozyten gleiche elektrophoretische Mobilität im Polyacrylamidgel besitzen.

Bezüglich dieser Fragestellung lassen sich die Ergebnisse der Polyacrylamidgelelektrophorese wie folgt interpretieren:

Die Lipoproteinfraktionen, welche aus VLDL und LDL, bzw. nur aus LDL bestehen, besitzen als Hauptapolipoprotein das Apolipoprotein B, welches das Hauptprotein der LDL darstellt und auch in den VLDL enthalten ist.

Dieses Protein stellt sich als Doppelbande dar, bei großer Proteinmenge konfluieren diese jedoch. Das Molekulargewicht beträgt ca. 260000 (27). Die elektrophoretische Mobilität dieses Apolipoprotein B ist nicht identisch mit jener von Plasmamembranproteinen der Erythrozyten, sodaß eine Identität auszuschließen ist.

Die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) besitzen als Hauptprotein die Apolipoproteine A-I und A-II.

Das Apolipoprotein A-I stellt sich als breite Einzelbande dar. Es besitzt ein Molekulargewicht von 28300 (28) und weist bezüglich seiner elektrophoretischen Mobilität keine Identität mit Plasmamembranproteinen der Erythrozyten auf. Das Apolipoprotein A-II stellt sich als Doppelbande dar. Bei großer Proteinmenge konfluieren diese beiden zu einer einzigen. Das Molekulargewicht beträgt 17000. (29). Bei den Plasmamembran-Präparaten von Erythrozyten kann zwar ein

Protein mit Molekulargewicht von 16500 nachgewiesen werden, welches in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Bande imponiert, die sich mit der Apolipoprotein A-II Bande annähernd deckt, jedoch handelt es sich hierbei um den Globinanteil des Hämoglobins, welcher sicher nicht mit Apolipoproteinen identisch ist (30).

Außer den hier beschriebenen Banden ergab die Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine Reihe von größtenteils feinen Banden. Eine Identität mit erythrozytären Plasmamembranproteinen hinsichtlich der elektrophoretischen Mobilität kann nicht für alle dieser Banden ausgeschlossen werden. Diese Banden können nicht näher charakterisiert werden und sollen als VLDL-LDL-bzw. HDL-Apolipoproteine bezeichnet werden.

In einigen Polyacrylamid-Gelen fanden wir eine Anfärbung am Oberrand des Gels. Dieses Phänomen dürfte durch Lipide bedingt sein. Swaney(27) fand in seinen Versuchen diese Anfärbung nicht mehr, wenn er zuvor die Lipide der Lipoproteine extrahierte.

IV DISKUSSION

Wir gingen in der vorliegenden Arbeit der Frage nach, ob Apolipoproteine identisch sind mit Plasmamembranproteinen von Erythrozyten. Zu diesem Zweck verglichen wir die elektrophoretische Mobilität dieser beiden Proteinfractionen im Polyacrylamidgel. Sollte sich dabei zeigen, daß Apolipoproteine und Plasmamembranproteine der Erythrozyten gleiche Wegstrecken zurücklegen, so wäre eine Identität möglich und müßte durch proteinchemische Untersuchungen verifiziert oder widerlegt werden.

Der Kenntnisstand über die Apolipoproteine hat in den letzten Jahren erheblich zugenommen und auch viel zum besseren Verständnis des Lipidmetabolismus beigetragen. Dennoch ist es zur Zeit noch nicht möglich, die Fülle an Einzelkenntnissen zu einem befriedigenden Gesamtbild zusammenzufügen. Es soll versucht werden, den gegenwärtigen Kenntnisstand über die Lipoproteine bzw. Apolipoproteine im Hinblick auf unsere Themenstellung zu interpretieren.

Das Apolipoprotein A-I besitzt ein Molekulargewicht von 28300. Es ist ein Protein mit bekannter Primärstruktur (28,31). Es wird angenommen, daß das Apolipoprotein A-I das Enzym LCAT aktiviert (32).

Eine Identität mit Membranproteinen von Erythrozyten konnten wir durch unsere Untersuchungen ausschließen.

Apoprotein A-II ist ein Protein mit ebenfalls bekannter Primärstruktur und einem Molekulargewicht von

17000. Es besteht aus zwei identischen Polypeptidketten, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (29,33,34). Das Apolipoprotein A-II soll die LCAT-Aktivierung des Apolipoproteins A-I kompetitiv hemmen (35).

A-I und A-II stellen mehr als 90 % des Proteinanteils der Lipoproteine hoher Dichte (HDL) und liegen im konstanten Gewichtsverhältnis 3:1 vor (36,37).

Auch für das Apolipoprotein A-II können wir sagen, daß eine Identität mit erythrozytären Membranproteinen auszu-schließen ist.

Das Apolipoprotein B stellt den Hauptproteinanteil der Lipoproteine geringer Dichte (LDL). Seine Primärstruktur ist nicht bekannt, es gilt jedoch als gesichert, daß es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 260000 handelt. Was seine Funktion betrifft, so nimmt man an, daß es ein Transportprotein der Chylomikronen, VLDL und LDL darstellt. (38).

Bezüglich unserer Themenstellung können wir sagen, daß keine Identität mit Membranproteinen der Erythrozyten besteht.

Das Apolipoprotein C wird unterteilt in die Proteine C-I, C-II und C-III.

Apolipoprotein C-I ist ein Molekül mit bekannter Primärstruktur und einem Molekulargewicht von 6331 (39).

Es gilt als LCAT-Aktivator (40) und außerdem als Aktivator des Enzyms Lipoproteinlipase (41).

Das Apolipoprotein C-II hat ebenfalls eine bekannte Primärstruktur und ein Molekulargewicht von 8837 (42). Funktionell wird es als Lipoproteinlipase-Aktivator angesehen (43).

Das Molekulargewicht von Apolipoprotein C-III beträgt 8764. Seine Primärstruktur ist ebenfalls bekannt (44). Ihm wird die Funktion eines Inhibitors der Lipoproteinlipase zugeschrieben (45).

Die Molekulargewichte der Apolipoproteine C-I, C-II und C-III sind so gering, daß die Proteine bei unseren Elektrophoresebedingungen durch das Gel hindurchgewandert sind. Das bedeutet aber auch, daß eine Identität mit Membranproteinen der Erythrozyten auszuschließen ist.

Das Apolipoprotein E, auch Arginin-reich-Protein oder Apolipoprotein X genannt hat ein Molekulargewicht von ca. 33000 (46). Seine Primärstruktur ist nicht bekannt. Durch Ionenaustauschchromatographie sind mehrere Formen dieses Apolipoproteins nachgewiesen worden (47). Es soll vor allem in den VLDL vorkommen und dort etwa 13 % des Proteingewichtsanteils ausmachen (48). Es wurde vermehrt gefunden bei der Hyperlipoproteinämie Typ III (49). Mittels isoelektrischer Fokussierung wurde das Apolipoprotein E unterteilt in E-I, E-II und E-III (50). Es ist noch nicht sicher, ob das Apolipoprotein E immer vorhanden ist, oder nur unter pathologischen Bedingungen auftritt. Da es jedoch lediglich einen Bruchteil des Proteinanteils der VLDL ausmacht, und diese ohnehin nur

zu etwa 12 % aus Proteinen besteht,dürfte die eventuell vorhandene Menge an Apolipoprotein E sicher unter der Nachweisgrenze der Polyacrylamid-Gelelektrophorese liegen.In wieweit eine Identität mit erythrozytären Plasmamembranproteinen besteht,läßt sich für das Apolipoprotein E nicht beurteilen.

Das Apoprotein D wurde aus HDL₃ isoliert und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 22700 (51).Man vermutet,daß es sich hierbei um eigenständige Lipoproteinpartikel handelt,die im Dichtebereich der HDL liegen (52).

Das Apolipoprotein A-III wurde ebenfalls aus HDL isoliert.Es wird als Aktivator von LCAT angesehen und enthält im Gegensatz zum Apolipoprotein D kein Cystein (2).

Ebenfalls aus HDL wurde jüngst das Apolipoprotein F isoliert mit einem Molekulargewicht von 26000-30000. Es soll ebenfalls eine eigene Spezies innerhalb der HDL darstellen (3).

Über die letztgenannten drei Apolipoproteine ,D,A-III und F ist jedoch noch zu wenig bekannt,als daß sie hier im Rahmen unserer Fragestellung,nämlich der Prüfung einer Identität mit Plasmamembranproteinen der Erythrozyten,diskutiert werden könnten.

Wir fanden in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese außer den beschriebenen Banden eine Reihe zum Teil sehr feiner Banden,die nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand nicht exakt benannt werden können und vorläufig einfach als

VLDL, LDL bzw. HDL-Apolipoproteine klassifiziert werden sollen. Diese Banden treten so multipel auf und sind zum Teil so fein, daß nicht beurteilt werden kann, ob sie intraindividuell bzw. interindividuell konstant sind. Auch kann eine identische elektrophoretische Mobilität mit Membranproteinen der Erythrozyten nicht für alle dieser Banden ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend können wir also feststellen, daß die Hauptapolipoproteine A-I, A-II, B, C-I, C-II und C-III keine identische elektrophoretische Mobilität mit Plasmamembranproteinen menschlicher Erythrozyten besitzen und es sich mit Sicherheit um verschiedene Proteine handelt.

Die Apolipoproteine E, D, A-III, F kommen zum Teil in geringen Mengen in den verschiedenen Dichteklassen der Lipoproteine vor. Über diese Apolipoproteine ist insgesamt noch wenig bekannt und es ist möglich, daß einige davon pathologische Apolipoproteine darstellen, also zum Beispiel nur bei Hyperlipoproteinämien oder anderen Stoffwechselerkrankungen vorkommen. Es kann mit der Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nicht sicher ausgeschlossen werden, daß diese Apolipoproteine identisch sind mit Plasmamembranproteinen der Erythrozyten.

Die Apolipoproteine, die nicht genauer benannt werden können und als VLDL-LDL-bzw. HDL Apolipoproteine klassifiziert wurden, können hinsichtlich der Themenstellung nur teilweise beurteilt werden, d.h. es ist nicht auszuschließen, daß einige davon gleiche elektrophoretische Mobilität aufweisen wie Erythrozytenmembranproteine.

Wir wollen abschließend noch kurz den Lipoproteinmetabolismus betrachten hinsichtlich der Frage einer möglichen Identität von Apolipoproteinen und Membranproteinen der Erythrozyten.

Die Chylomikronen und VLDL transportieren in erster Linie Triglyceride zu den Körperzellen. Daraus werden durch das Enzym Lipoproteinlipase freie Fettsäuren abgespalten, die dann durch die Zellmembran hindurchdiffundieren. Es spricht also nichts dafür, daß eine Interaktion zwischen den entsprechenden Apolipoproteinen und Plasmamembranproteinen der Zellen stattfindet.

Die LDL werden von den Zellen an spezifische Plasmamembranrezeptoren gebunden und durch Endozytose aufgenommen. Die LDL transportieren in erster Linie Cholesterin in die Zellen. Bei dieser Endozytose werden die LDL-Partikel von der Plasmamembran der aufnehmenden Zelle umhüllt, werden jedoch nicht in die Membran integriert. Für das Hauptprotein der LDL, nämlich das Apolipoprotein B, ist eine Identität mit Membranproteinen ausgeschlossen und es ist kaum denkbar, daß andere LDL-Apolipoproteine, die nur in geringer Menge in den LDL enthalten sind, in die Plasmamembran integriert sind.

Natürlich haben diese metabolischen Betrachtungen hinsichtlich ihrer Anwendung auf unsere Themenstellung nur hypothetischen Charakter und stellen keine naturwissenschaftlichen Beweise dar.

Man kann nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnisse eine Identität zwischen Apolipoproteinen und Plasmamembran-

proteinen menschlicher Erythrozyten mit weitgehender Sicherheit ausschließen, oder anders formuliert: Apolipoproteine des menschlichen Plasmas sind keine integrierten Bestandteile der Plasmamembran menschlicher Erythrozyten. Dies wurde für jene Apolipoproteine, welche den Hauptbestandteil ausmachen, mit Sicherheit nachgewiesen. Für die Apolipoproteine, die noch kaum bekannt sind, oder die wir nicht klassifizieren konnten, ist eine Identität mit Membranproteinen sehr unwahrscheinlich.

Es ist selbstverständlich, daß Apolipoproteine Kontakt mit Membranproteinen haben können und auch an Membranen adsorbiert sein können. Diese Tatsache läßt jedoch keine wichtigen Folgerungen zu, welche es rechtfertigen würden, der von uns gestellten Themafrage intensiv nachzugehen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Wir verglichen die elektrophoretische Mobilität von Apolipoproteinen des menschlichen Plasmas mit der von Plasmamembranproteinen menschlicher Erythrozyten im SDS-Polyacrylamidgel und wollten damit prüfen, ob eventuell eine Identität zwischen diesen beiden Proteinfraktionen besteht.

Für die Hauptapolipoproteine A, B und C konnten wir eine Identität mit Plasmamembranproteinen mit Sicherheit ausschließen.

Für andere, noch wenig bekannte Apolipoproteine sowie für Apolipoproteine, die wir nicht klassifizieren konnten, war allein durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein Identitätsausschluß nicht sicher möglich.

Diese Proteine, für die eine Identität mit Plasmamembranproteinen nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, stellen jedoch nur einen Bruchteil der Apolipoproteine dar.

Es ist mit weitgehender Sicherheit anzunehmen, daß Apolipoproteine keine integrierten Bestandteile der Plasmamembranproteine menschlicher Erythrozyten darstellen.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Alaupovic, P., G. Kostner, D. M. Lee, W. J. Mc Conathy and H. Magnani (1972) Expo. Annu. Biochim. Med. 31, 145-160
- 2) Kostner, G. M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 336, 383-395
- 3) Olofsson, S., W. Mc Conathy and P. Alaupovic (1977) Circulation. 56 (Suppl): III-56
- 4) K. W. A. Wirtz (1974) Biochim. Biophys. Acta 344, 95-117
- 5) Eisenberg, S. (1978) J. Lipid Res. 19, 229-236
- 6) Kashyap, M. L., L. S. Srivastava, C. Y. Chen, G. Perisutti, M. Campbell, R. F. Lutner, and C. J. Glueck (1977) J. Clin. Invest. 60, 171-180
- 7) Havel, R. J., J. P. Kane and M. L. Kashyap. (1973) J. Clin. Invest. 52, 32-38
- 8) Havel, R. J., Eder H. A., Bragdon, J. H. (1955) J. Clin. Invest. 34, 1345-1353
- 9) Zilversmit, D. B. (1975) Biochim. Biophys. Acta 409, 393-398
- 10) Langdon R. G. (1974) Biochim. Biophys. Acta 342, 213-228
- 11) Green, J. R., Dunn, M. J., Maddy, A. H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 382, 457-461
- 12) Carey C., Wang, C. S., Alaupovic, P. (1975) Biochim. Biophys. Acta 401, 6-14
- 13) Redgrave, T. G., Roberts, D. C. K., West, C. E. (1975) Anal. Biochem. 65, 42-49
- 14) Rudel, L. L., Lee, J. A., Morris, M. D., Felts, J. M. (1974) Biochem. J. 139, 89-95

- 15) Shepherd, J., Packard, C.J., Dryburgh, F.J., Third, J.L.H.C.
(1975) Clin.Chem. 21/13, 1887-1891
- 16) Dodge J.T., Mitchell C. and Hanahan D.J. (1963)
Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-130
- 17) Steck T., Weinstein R.S., Strauss J.H. and Wallach
D.F.H. (1970) Science 168, 255-257
- 18) V. Anselstetter
" Entwicklung eines Verfahrens der Zweidimensionalen
Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteine und
Glycoproteine der Zytoplasmamembran, erarbeitet am
Erythrozyten des Menschen"
Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität
Erlangen-Nürnberg (1974)
- 19) Schwoch G. und Passow H. (1973) Mol.Cell. Biochem.
2, 197-218
- 20) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.
(1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275
- 21) Wang C.S. and Smith R.L. (1975) Anal. Biochem.
63, 414-417
- 22) Stierstorfer S., Horstmann H.J., Anselstetter V.
(1977) Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 358, 1287
- 23) Instruction Manual, Multiphor Immunelectrophoresis Kit
2117-401. LKB Instruments GmbH
- 24) Application Note LKB 2117 Multiphor
Procedures for Immunelektrophoresis and
Immunodiffusion. LKB Instruments GmbH
- 25) Weber K. und Osborn M. (1969) J.Biol. Chem.
244, 4406-4412
- 26) Dunker A.K. und Rueckert R.R. (1969) J.Biol.
Chem. 244, 5074-5080

- 27) Swaney J.B. and Kuehl K.S. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 446,561-565
- 28) Brewer H.B., Jr., T. Fairwell, A. Larue, R. Ronan,
A. Houser and T. Bronzert (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80,623-630
- 29) Lux S.E., John K.M. and Brewer H.B. Jr. (1972)
J. Biol. Chem. 247,7510-7518
- 30) Fairbanks G., Steck T.L. and Wallach D.F.H (1971)
Biochemistry 10,2606-2617
- 31) Baker H.N., Delahunty T., Gotto A.M., Jr. and Jackson R.L.
(1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71,3631-3634
- 32) Fielding C.J., V.G. Shore, P.E. Fielding (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46,1493-1498
- 33) Lux S.E., John K.M., Ronan R. and Brewer H.B., Jr.
(1972) J. Biol. Chem. 247,7519-7527
- 34) Brewer H.B., Jr., S.E. Lux, R. Ronan, K.M. John (1972)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69,1304-1308
- 35) Yokohama S. (1978) Biochim. Biophys. Acta
530,258-266
- 36) Levy R.I., C.B. Blum, E.J. Schaffer (1976)
Lipoprotein Metabolism, Springer-Verlag, Berlin 56-64
- 37) Friedberg S.J. and Reynolds J.A. (1976)
J. Biol. Chem. 251,4005-4009
- 38) Gotto A.M., Jr., R.I. Levy, K. John, D.S. Fredrickson
(1971) N. Engl. J. Med. 284,813-818
- 39) Shulman R.S., P.N. Herbert, K. Wehrly, D.S. Fredrickson
(1975) J. Biol. Chem. 250,182-190
- 40) Jackson R. (1976) Physiol. Rev.
56,259-316
- 41) Ganesan D., H.B. Bass (1975) FEBS Letters
53,1-4

- 42) Jackson R.L., H.N. Baker., E.B. Gilliam and A.M. Gotto
(1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 1942-1945
- 43) La Rosa J.C., R.I. Levy, P.N. Herbert, S.E. Lux
and D.S. Fredrickson (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 57-62
- 44) Brewer H.B., Jr., R. Shulman, P. Herbert, R. Ronan
and K. Wehrly (1974) J. Biol. Chem. 249, 4975-4984
- 45) Brown W.V., M.L. Baginsky (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 375-381
- 46) Shore B. and V.G. Shore (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 107
- 47) Shelburne F.A. and S.H. Quarfordt (1974)
J. Biol. Chem. 249, 1428-1433
- 48) Kane J.P., T. Sata, R.L. Hamilton and R.J. Havel
(1975) J. Clin. Invest. 56, 1622-1634
- 49) Havel R.J. and J.P. Kane (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA
70, 2015-2019
- 50) Utermann G., M. Jaeschke and J. Menzel (1975)
FEBS Lett. 56, 352-355
- 51) Mc. Conathy, W.J. and P. Alampovic (1973)
FEBS Lett. 37, 178-182
- 52) Mc Conathy W.J. and P. Alaupovic (1976)
Biochemistry 15, 515-520

Lebenslauf

Am 30. Dezember 1951 wurde ich, Otto Kunz, als drittes Kind des Maurers Franz Kunz und seiner Ehefrau Auguste, geb. Herbrich in Nürnberg geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich ab Herbst 1962 das Hardenberg Gymnasium in Fürth/Bay., an welchem ich im Juni 1971 das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1972 begann ich an der Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Medizinstudium. Im Mai 1979 schloß ich das Studium mit dem dritten Abschnitt des ärztlichen Staatsexamens in Erlangen ab.

Ab November 1975 arbeitete ich im Institut für Physiologische Chemie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.J. Horstmann an der vorliegenden Dissertation.

Herrn Prof. Dr. W. Kersten und Herrn Prof. Dr. K. Brand danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Für die Anregungen, Diskussionen und die stets großzügig gewährte Hilfe danke ich Herrn Prof. Dr. H.J. Horstmann sehr herzlich.

